Untersuchungen über Steroidbestimmung in Körperflüssigkeiten mittels der Dünnschichtchromatographie

Manfred Straile

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0093

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

UNTERSUCHUNGEN ÜBER STEROIDBESTIMMUNG IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN MITTELS DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Manfred Straile

aus

München

1967

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Seitz
Dekan:	Prof. Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 2. 1967

MEINER MUTTER

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Methodik	1
Herstellung der Platten zur Dünnschicht-chromatographie	1
Herstellung der zu untersuchenden Reinsubstanzen	1
Substanzen	1
Sprühmittel	2
Versuche	3
Bestimmung der Nachweisgrenzen	3
Ermittlung der günstigsten Fließmittelgemische	3
Bestimmung der Nachweisgrenzen nach Chromatographie	4
Extraktion von Cortisol aus Serum	5
Bemerkungen über eigene Erfahrungen mit den angegebenen Methoden	6
Quantitative Bestimmung von Cortisol	7
Bestimmung der Prednisolonausscheidung im Harn	12
Diskussion	14
Zusammenfassung	15
Literaturnachweis	16

Die bekannten Methoden zur quantitativen Bestimmung von Steroidhormonen im menschlichen Serum erfordern einen großen Aufwand an Material und Zeit, so daß sie, abgesehen von der Bestimmung einzelner Hormongruppen, noch keine Anwendung im klinischen Laboratorium gefunden haben.
In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie dieser Aufwand so verringert werden kann, daß eine routinemäßige Bestimmung der einzelnen Steroidhormone des Serums bzw. Harns im klinischen Laboratorium möglich wird.

METHODIK

Herstellung der Platten zur Dünnschichtchromatographie

30 g Kieselgel G (Merck) werden mit 70 ml Aqua dest. gut verrührt und mit dem Streichgerät (Fa. Desaga, Heidelberg) in der gewünschten Schichtdicke auf die Glasplatten aufgebracht. Nach dem Abbinden der Schicht werden die Platten etwa eine Stunde lang bei 80 - 100° C im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen sind die Platten gebrauchsfertig. Für die folgenden Versuche wurde eine Schichtdicke von 0,25 mm gewählt.

Herstellung der zu untersuchenden Reinsubstanzen

Die einzelnen Hormone standen zum Teil in Tablettenform, zum Teil in öliger Lösung zur Verfügung. Die Tabletten wurden jeweils in 5 ml Aqua dest. gelöst und daraus dreimal (1) (4) mit je 3 Vol. Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden so eingeengt, daß 1 ml Lösung 1 mg Substanz enthielt. Die öligen Lösungen wurden so verdünnt, daß ebenfalls 1 ml Lösung einem Milligramm Substanz entsprach. Der ölige Anteil wurde nicht abgetrennt. Aufgetragen wurde mit 0,1 ml Pipetten, bei welchen ein Teilstrich 0,001 ml entspricht.

Substanzen

Dexamethason	= 9 α -Fluor-16-Methylprednisolon
Orgasteron	= Methylöstrenolon
Scherisolon	= Prednisolon
Decortilen	= 16-Methylprednisolon
Deca-Durabolin[1)]	= 19-Nor-Androstenolondecanoat

Sustanon[1)]	= 3 T. Testosteronpropionat
	+ 6 T. Testosteronphenylpropionat
	+ 6 T. Testosteronisocapronat
	+10 T. Testosteroncaprinat
Cortison-Hoechst	= Cortison
Hydrocortison-Hoechst	= Hydrocortison
Testoviron	= Methyltestosteron
Progynon	= Östradiol
Primobolan	= 1-Methyl-Androstenolonacetat

1) = in öliger Lösung

Sprühmittel

Antimontrichlorid in Chloroform (1)
25 g Antimontrichlorid werden in 100 ml Chloroform unter Erwärmen gelöst. Nach dem Besprühen wird 10 min. bei 110° C getrocknet und anschließend im U. V. Licht (366 mμ) betrachtet.

Vanillin in 50 %iger Phosphorsäure (1)
0, 2 g Vanillin werden in 100 ml 50 %iger Phosphorsäure gelöst. Nach dem Besprühen wird 10 min. bei 110° C getrocknet.

Alkalische Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid in Methanol (1)
2 g TTC werden in 50 ml Methanol, 2 g NaOH ebenfalls in 50 ml Methanol gelöst. Beide Lösungen werden zu gleichen Teilen gemischt. Nach dem Besprühen wird 5 min. bei 80° C getrocknet.

Anisaldehyd in Eisessig und konz. Schwefelsäure (1) 0, 5
0, 5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig, dazu 1 ml konz. Schwefelsäure. Nach dem Besprühen wird 6 min. bei 120° C getrocknet.

2 %ige Perchlorsäure (1)
Nach dem Besprühen wird 10 min. bei 150° C erhitzt.

VERSUCHE

Bestimmung der Nachweisgrenzen

Zur Orientierung über die Wirksamkeit der einzelnen Sprühmittel wurden absteigende Substanzmengen aufgetragen, ohne Chromatographie besprüht und nach Vorschrift weiterbehandelt.

Tab. I Nachweisgrenzen der aufgetragenen Substanzen (ohne Chromatographie)

Substanz	Geringste nachgewiesene Menge in µg mit: Antimontrichlorid	Vanillinphosphorsre.	TTC	Anisaldehyd	Perchlorsäure
Dexamethason	(x)	(-)	0,1	0,05	0,1
Orgasteron	(x)	0,1	(-)	0,03	0,1
Scherisolon	(-)	0,1	0,1	0,03	(x)
Decortilen	1,0	0,1	0,1	0,03	(x)
Deca-Durabolin	(x)	0,1	(-)	0,01	(x)
Sustanon	(x)	(-)	(-)	0,01	(x)

(-) = keine Reaktion, (x) = nicht untersucht

Die auffallend hohe Empfindlichkeit des Nachweises mit Anisaldehyd in Eisessig und Schwefelsäure ist wohl dadurch zu erklären, daß der Schwefelsäureanteil alle organischen Bestandteile nachweist. Zudem wird bei Sustanon und Deca-Durabolin eine höhere Empfindlichkeit dadurch vorgetäuscht, daß der ölige Anteil nicht abgetrennt wurde und so ebenfalls nachgewiesen wird. Das Triphenyltetrazoliumchlorid erhält durch seine Eigenschaft, nur reduzierende Substanzen nachzuweisen, eine gewisse Spezifität (1).

Ermittlung der günstigsten Fließmittelgemische

Zu diesem Zweck wurden jeweils größere Substanzmengen (ca. 10 µg) aufgetragen und chromatographiert.
Es wurden untersucht:
Verschiedene Gemische von Chloroform mit Aceton (1)
Cyclohexan - Isopropanol im Verhältnis 7:3 (V:V) (2)
Chloroform - Eisessig im Verhältnis 4:1 (V:V) (2)
Der Nachweis erfolgte mit Triphenyltetrazoliumchlorid und 50 %iger Phosphorsäure. Bei Sustanon traten zwei Fraktionen auf, die nicht identifiziert wurden.

Es sind die Rf - Werte beider Fraktionen angegeben.
Wie aus Tabelle II zu ersehen ist, ergeben die Fließmittel Chloroform - Aceton 10:3 (V:V) und Cyclohexan-Isopropanol gute Trennungen, besonders von Cortison und Hydrocortison. Das Gemisch Chloroform - Aceton ist jedoch vorzuziehen, da es nach der Chromatographie schneller von der Platte abdunstet. Bei Verwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid als Nachweismittel ist dies wichtig, da sowohl Aceton als auch Isopropanol eine Farbreaktion zeigen.

Tab. II RF - Werte einiger Substanzen mit verschiedenen Fließmitteln

Substanz	Rf - Wert bei Fließmittel:				
	Chl-Ac 3:2	Chl-Ac 10:3	Chl-Ac 6:1	Chl-Ac 10:1	Cycloh.-Isopr. 7:3
Dexamethason	0,27	0,14	0,04	0,01	0,29
Scherisolon	0,24	0,09	0,02	0,00	0,16
Decortilen	0,19		0,03	0,00	0,15
Cortison	0,49	0,46	0,31	0,09	0,40
Testoviron	0,62	0,52	0,45	0,31	0,52
Progynon	0,56	0,49	0,44	0,24	0,59
Primobolan		0,70		0,63	0,60
Hydrocortison		0,10			
Sustanon	0,72 0,83	0,71 0,83	0,71 0,87		
Deca-Durabolin	0,73	0,82	0,55		
Orgasteron	0,55	0,50	0,09	0,02	0,50

Bestimmung der Nachweisgrenzen nach Chromatographie

Dazu wurden die Substanzmengen solange verringert, bis sie nicht mehr nachweisbar waren. Als Sprühmittel dienten Triphenyltetrazoliumchlorid und 50 %-ige Phosphorsäure, als Fließmittel Chloroform - Aceton 10:3 (V:V)

Tab. III Nachweisgrenzen in µg nach Chromatographie

Substanz	NW-Grenze in µg mit: TTC	H_3PO_4	Substanz	NW-Grenze in µg mit: TTC	H_3PO_4
Dexamethason	0,5	0,1	Sustanon	ø	0,1
Orgasteron	1,0	0,5	Deca-Durabolin	ø	0,1
Prednisolon	0,1	1,0	Menformon	ø	0,5
Decortilen	0,1	ø	Progynon M	ø	0,5
Cortison[1)]	0,05	0,05	Ovestin	ø	0,5
Testoviron	ø	0,5	Androtest.PP	1,0	0,5
Progynon	ø	0,5	Androteston	1,0	0,5
Primobolan	ø	0,1	Aldosteron	0,1	1,0
Hydrocortison	0,05	0,03			

ø = keine Reaktion, [1)] = auf Platten von 0,1 mm Dicke

Die in Tabelle III gefundenen Werte sind nur bei guter Technik zu erreichen, die Flecken waren nur noch schwach zu sehen.

Extraktion von Cortisol aus Serum

Methode I, modifiziert nach Peterson et al. (3)
10 ml Serum werden mit 50 ml Methylenchlorid extrahiert, indem das Gemisch in einem 200 ml Erlenmeyerkolben mittels Magnetrührer 10 min. gerührt wird. Das Gemisch wird sodann vorsichtig in einen 50 ml Meßzylinder übergeführt und die Serumschicht abgesaugt. Anschließend wird die Methylenchloridlösung kurz mit 4 ml 0,1 n NaOH geschüttelt und die überstehende Natronlauge nach Phasentrennung abgesaugt. Die Methylenchloridlösung wird nun im Rotations-

verdampfer bei 40° C und vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Trockenrückstand wird mit Chloroform quantitativ in ein Reagenzglas übergeführt und die Lösung im Wasserbad bei 50° C erneut zur Trockne eingedampft, wobei der letzte Lösungsmittelrest mit Stickstoff vertrieben wird. Der Trockenrückstand wird nun in 0,5 ml Chloroform aufgenommen und insgesamt auf die Platte aufgetragen.

Methode II, modifiziert nach Eik - Nes (4)
10 ml Serum werden mit Aqua dest. auf 20 ml verdünnt und dreimal mit je 30 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden mit 5 ml 0,1 n NaOH geschüttelt und diese nach Phasentrennung vorsichtig abgesaugt. Einengen des Extraktes wie bei Methode I.

Methode III, modifiziert nach Silber und Busch (5)
12 ml Serum werden der Reihe nach mit je 2,5 Vol. Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther extrahiert, indem man 15 sec. schüttelt, zentrifugiert und die organische Lösungsmittelphase absaugt und verwirft. Anschließend werden 10 ml der Serumprobe mit 25 ml Methylenchlorid kurz geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wird die überstehende Serumschicht vorsichtig abgesaugt und erneut mit 10 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden mit 3 ml 0,1 n NaOH gewaschen. Einengen des Extraktes wie bei Methode I.

Bemerkungen über eigene Erfahrungen mit den angegebenen Methoden

Mit jeder der angegebenen Methoden konnte Cortisol weitgehend aus der jeweiligen Serumprobe extrahiert werden. Zur Kontrolle wurde das Serum nach der ersten Extraktion in gleicher Weise erneut extrahiert. In dem zweiten Extrakt waren keine chromatographisch nachweisbaren Mengen von Cortisol mehr vorhanden. Bei den nach der Methode von Silber und Busch durchgeführten Extrakten zeigten sich im Chromatogramm die wenigsten, den Nachweis störenden, Begleitsubstanzen.
Bezüglich des Ausschüttelns wäre zu bemerken, daß sich bei heftigem Schütteln der Serumprobe mit Methylenchlorid eine Emulsion bildet, die auch durch längeres scharfes Zentrifugieren nicht ganz beseitigt werden kann. Um dies zu vermeiden, haben sich folgende Maßnahmen bewährt:

1. Verwendung von gut gekühlten Serum und Lösungsmitteln (6)
2. Anstatt Schütteln nur Kippen der Zylinder, so daß sich die Flüssigkeiten durchströmen.
3. Oder an Stelle des Schüttelns Verwenden eines Magnetrührers im Erlenmeyerkolben. Bei genügend hoher Drehzahl werden die Flüssigkeiten gut gemischt, ohne daß sich die störende Emulsion bildet. Allerdings ist wegen der größeren Oberfläche der Trennschicht das Absaugen nicht genau durchzuführen, weshalb das Gemisch erst in einen Meßzylinder übergeführt werden muß, was einen Substanzverlust zur Folge hat.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß bei allen Manipulationen mit organischen Lösungsmitteln der Kontakt mit Gummi vermieden werden muß, da der Gummi in Spuren in Lösung geht und auf dem Chromatogramm als Verunreinigung auftritt. Weiterhin zeigte sich bei der Chromatographie von Serumextrakten, daß die Empfindlichkeit der verwendeten Nachweismethoden dabei wesentlich geringer ist. Es waren mindestens 10 ml Serum notwendig, um noch gut sichtbare Flecke zu erhalten. Das entspricht bei einer durchschnittlichen Serumkonzentration des Cortisol von 12 µg% (7) (8) (9) einer Menge von etwa 1,2 µg. Wahrscheinlich kommt diese Verminderung der Empfindlichkeit dadurch zustande, daß mit den angewandten Extraktionsverfahren nicht nur das Cortisol extrahiert wird, sondern auch andere Substanzen, die eine Verunreinigung des Chromatogramms bedingen und so den Nachweis stören.

Quantitative Bestimmung von Cortisol

Reaktion nach Peterson et al. (3)
Zur Standardlösung - 1, 5, 10 µg Cortisol in je 10 ml Methylenchlorid - werden 0,2 ml Phenylhydrazinreagenz (50 mg Phenylhydrazinhydrochlorid in 50 ml Leerreagenz = 2 Vol. 64 %ige Schwefelsäure + 1 Vol. abs. Äthanol) zugesetzt. Die verschlossenen Reagenzgläser werden kurze Zeit geschüttelt und die überstehende Methylenchloridlösung nach Phasentrennung abgesaugt und verworfen. Dann wird eine Stunde bei 60° C inkubiert. Um eine ausreichende Küvettenfüllung zu erhalten, wurden vor dem Inkubieren 4 ml Leerreagenz zugesetzt. Nach dem Abkühlen wird die Extinktion bei 410 mµ im Zeiss-Spektralphotometer gemessen. Als Leerwert dienen 10 ml reines Methylenchlorid, das entsprechend behandelt wird. Die Empfindlichkeit der Methode liegt bei etwa 1 µg (siehe Abb. I).

Die gleiche Empfindlichkeit in der quantitativen Bestimmung ergab sich mit folgender Methode (10):
Die Chromatogramme mit den Reinsubstanzen in aufsteigender Menge werden mit Triphenyltetrazoliumchlorid besprüht und 5 min. bei 80° C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die Flecke in ein Reagenzglas abgekratzt und der Kieselgel eluiert. Nach dem Zentrifugieren wird die äthanolische Phase abgesaugt und sofort bei 480 mµ gegen einen Kieselgelleerwert photometriert. Die folgenden Abbildungen zeigen die ermittelten Extinktionswerte für die einzelnen Substanzmengen in graphischer Darstellung (siehe Abb. II. III. IV).

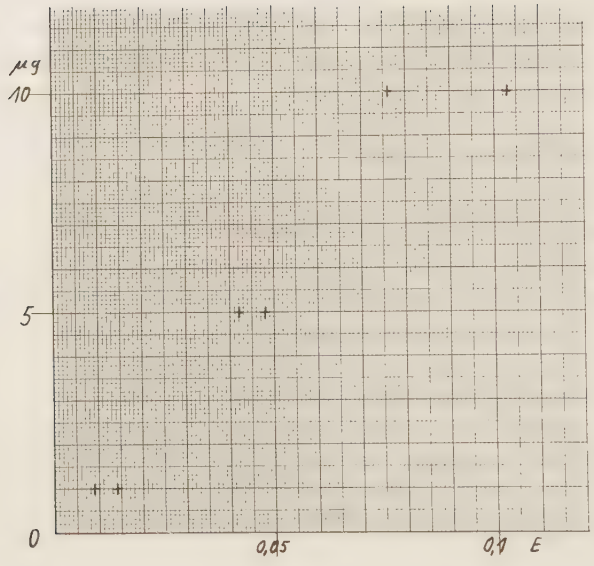

Abb. I Graphische Darstellung der Extinktionswerte aus zwei Bestimmungen von Cortisol mit Phenylhydrazin.

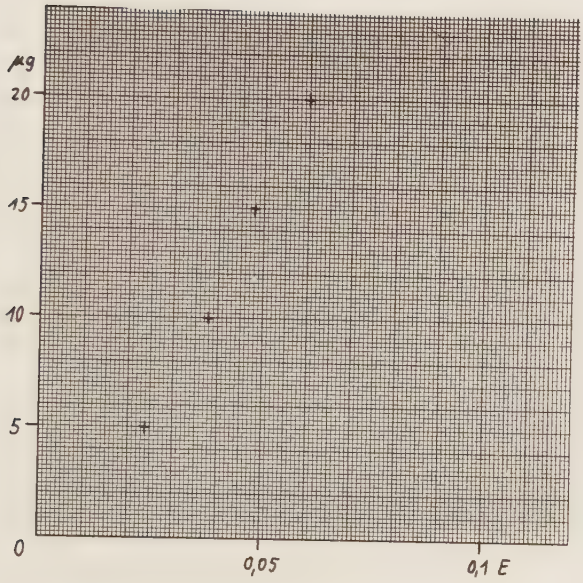

Abb. II Graphische Darstellung der Extinktionswerte aus einer Bestimmung von Cortisol mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Beim Besprühen wurde die Sprühdüse 60 mal über die Platte geführt.

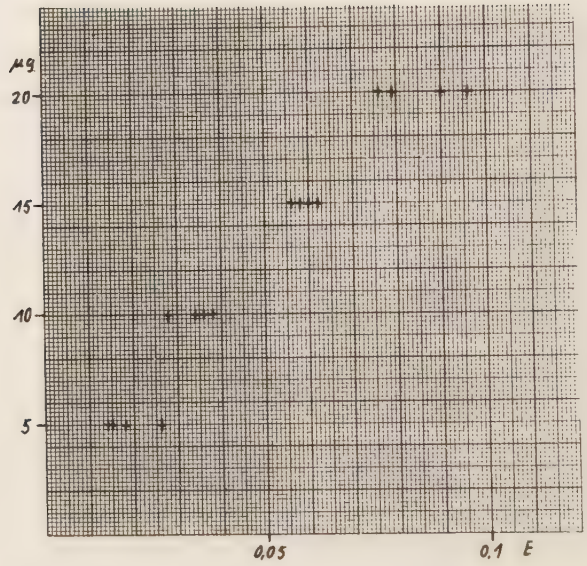

Abb. III Graphische Darstellung der Extinktionswerte aus einer Vierfachbestimmung von Cortisol mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Die Platte wurde bis zur Durchfeuchtung besprüht.

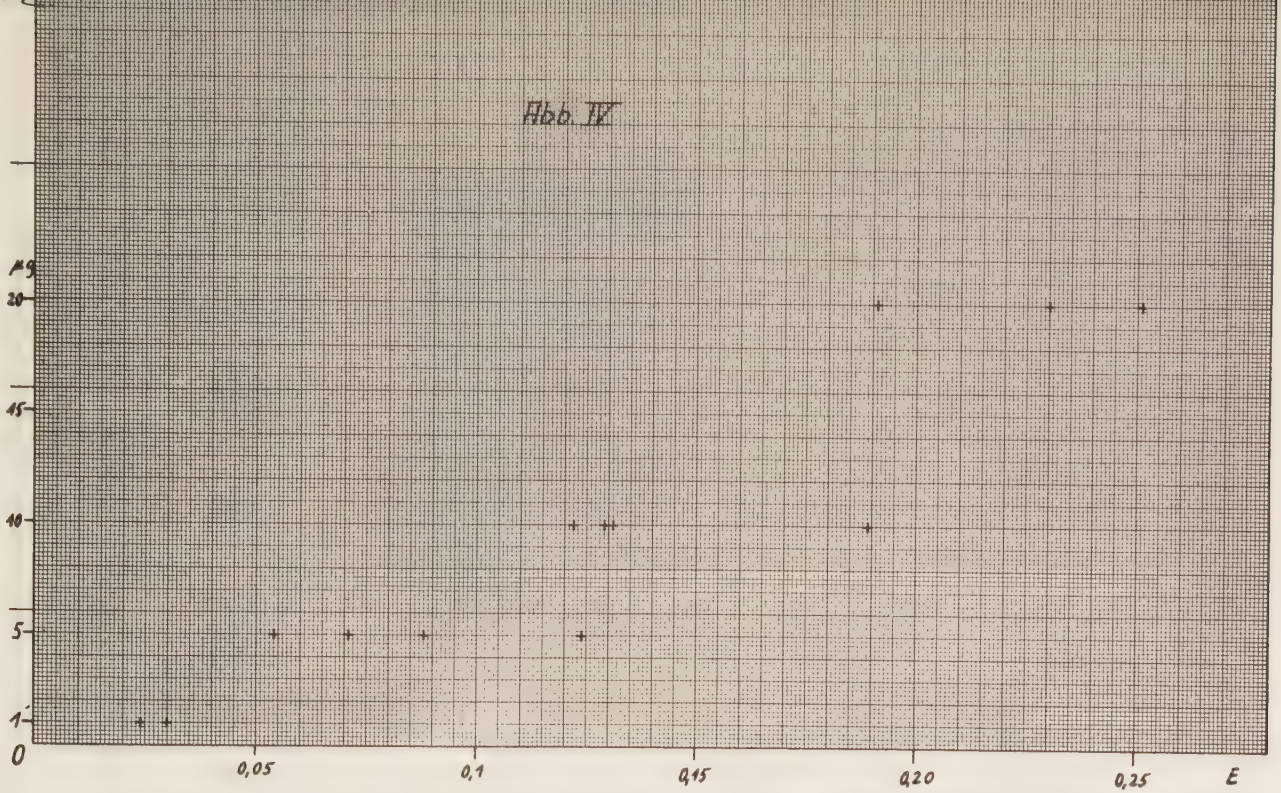

Abb. IV Graphische Darstellung der Extinktionswerte aus vier Bestimmungen. Die Platten wurden bis zur Durchfeuchtung besprüht. Es wurden schmale Küvetten (2 mm) von gleicher Schichtdicke verwendet. Dabei waren nur 2 ml Elutionsmittel nötig, wodurch die Konzentration des Farbkomplexes im Äthanol und somit die Extinktionswerte erhöht wurden.

Bestimmung der Prednisolonausscheidung im Harn

Als Beispiel einer Steroidbestimmung im Harn mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde die Ausscheidung von Prednisolon im Harn einer Patientin untersucht, die unter einer Dauertherapie mit täglich 50 mg Prednisolon stand. Der Harn wurde in drei Portionen, 75 min. (I), 135 min. (II) und 195 min. (III) nach oraler Zufuhr des Medikaments gesammelt. Von den einzelnen Proben (I = 47 ml, II = 120 ml, III = 200 ml) wurden jeweils 10 ml dreimal mit je 30 ml Chloroform ausgeschüttelt und die vereinigten Extrakte im Rotationsverdampfer bei 50° C und vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit Chloroform quantitativ in ein Reagenzglas übergeführt, im Wasserbad bei 50° C erneut eingedampft, dabei der letzte Lösungsmittelrest mit Stickstoff vertrieben und der Rückstand in 1 ml Chloroform gelöst. Davon wurden 0,1 ml aufgetragen und mit Chloroform-Aceton 10:3 (V:V) als Fließmittel chromatographiert. Der Nachweis erfolgte mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Als Referenzsubstanz diente Prednisolon (10 µg), das in angegebener Weise aus Tabletten (Scherisolon) gewonnen wurde.

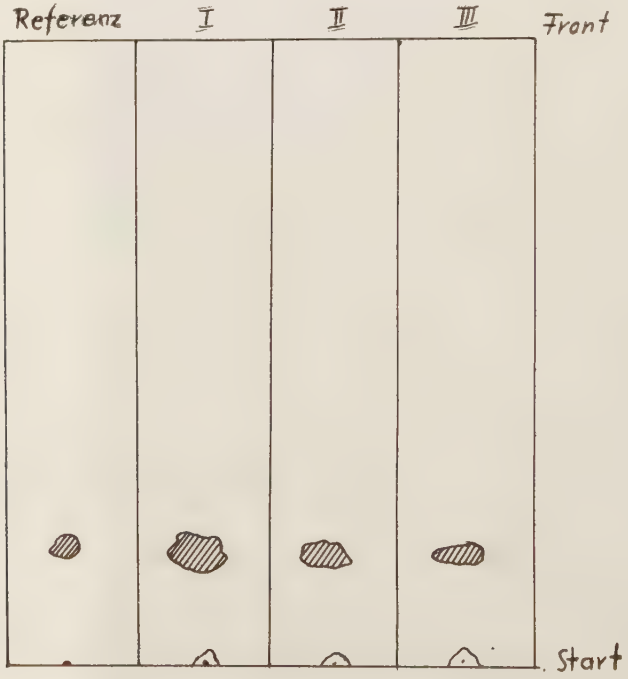

Abb. V Dünnschichtchromatogramm von Harnextrakten nach 50 mg Prednisolon p. o.

Dieses Verfahren ermöglicht zwar eine semiquantitative Auswertung der Chromatogramme durch Vergleich der Fleckengrößen, nach Berücksichtigung der unterschiedlichen Harnmengen sind jedoch nur annähernd genaue Werte zu erwarten. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch unter gleichen Bedingungen, nachdem die Extraktion des Harns wie im vorigen Versuch durchgeführt war, die Prednisolonflecken mit dem Kieselgel abgekratzt und mit 2 ml Methanol eluiert. Die Extinktion bei 480 mμ wurde gegen einen Kieselgelleerwert gemessen und der absolute Wert über die Extinktion eines 10 μg - Standardwertes von der gleichen Dünnschichtplatte berechnet. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung VI dargestellt und zeigt, daß dieses Verfahren empfindlich genug ist, um z.B. bei Stoffwechseluntersuchungen mit Erfolg angewandt zu werden.

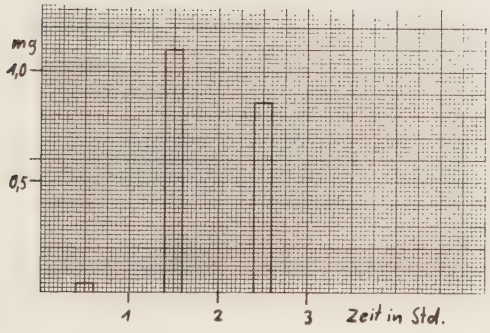

Abb. VI Pro Stunde ausgeschiedene Mengen Corticoid nach 50 mg Prednisolon p.o. (Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

DISKUSSION

Während die Nachweisgrenzen beim qualitativen Nachweis der Reinsubstanzen relativ niedrig sind (um 0,1 µg, siehe Tabelle III), zeigte sich schon beim qualitativen Nachweis von Cortisol aus dem Serum eine deutliche Erhöhung dieser Grenze. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1 µg (siehe Abb. IV), so daß bei einer durchschnittlichen Serumkonzentration des Cortisol von 10 µg% 10 ml Serum notwendig sind, um eine nachweisbare Substanzmenge zu erhalten.
Die Porter-Silber-Reaktion im Zusammenhang mit der Lösungsmittelverteilung zeigt eine Empfindlichkeit von 0,1 - 1 µg (4) (11). Allerdings wird dabei nicht nur das Cortisol erfaßt, sondern alle 17-Hydroxycorticosteroide. Die Fluorometrie im Zusammenhang mit der Papierchromatographie zeigt eine hohe Spezifität und eine Empfindlichkeit von 0,01 µg (12). Damit verbunden ist jedoch ein großer Aufwand an Zeit und Material.
Die Vorteile, die eine gute und mit geringem Aufwand verbundene Trennungsleistung der Dünnschichtchromatographie zweifelsohne bringt, werden durch die geringe Empfindlichkeit der in dieser Arbeit untersuchten quantitativen Bestimmungsmethoden für Cortisol nach Dünnschichtchromatographie weitgehend aufgehoben. Da für eine Bestimmung eine Blutentnahme von etwa 20 ml nötig wird, ist wegen der dabei benötigten großen Ausgangsmengen, für die quantitative Bestimmung von Cortisol in der klinischen Routineuntersuchung - z. B. die Beobachtung des Verlaufs der Serumkonzentration - die Kombination keiner der geprüften Reaktionen mit der Dünnschichtchromatographie geeignet.

Im Gegensatz dazu zeigt sich die Methode für die Bestimmung der Steroidausscheidung im Harn durchaus geeignet, da die Konzentrationen im Harn höher sind als im Serum.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht, unter Anwendung der Dünnschichtchromatographie eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Steroidhormonen im menschlichen Serum zu entwickeln, die bezüglich ihres Aufwands an Zeit und Material für die klinische Routineuntersuchung geeignet sein sollte. Die Dünnschichtchromatographie ermöglicht zwar eine ausreichende Trennung von Cortisol und Cortison, die Nachweisgrenzen liegen aber bei der Bestimmung nach Bernauer (10) so hoch, daß sich mit der vorgeschlagenen Methode neben der höheren Spezifität gegenüber den Methoden von Eik - Nes (4) und Kassenaar et al. (11) nur eine Ersparnis an Zeit ergibt. Das benötigte Ausgangsmaterial liegt mit etwa 15 - 20 ml Blut für eine Bestimmung noch relativ hoch.
Für die Bestimmung der Steroidausscheidung im Harn erweist sich die Dünnschichtchromatographie jedoch als geeignet.

LITERATURNACHWEIS

(1) H. Metz: Dünnschichtchromatographische Schnellanalyse bei enzymatischen Steroidumsetzungen.
Naturwissenschaften 48 11 (1961)

(2) O. Nishikaze u. H. Staudinger: Dünnschichtchromatographische Isolierung von Aldosteron aus Harn.
Klin. Wschr. 40 19 (1962)

(3) R.E. Peterson, A. Karrer u. S.L. Guerra: Analyt. Chem. 29 144 (1957) zit. nach G. W. Oertel: Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Plasma. (Springer-Verlag 1962)

(4) K.B. Eik-Nes J. clin. Endocr. 17 502 (1957) zit. nach G. W. Oertel

(5) R.H. Silber u. R.D. Busch: J. clin. Endocr. 16 1333 (1956) zit. nach G.W. Oertel

(6) G. W. Oertel: Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Plasma. (Springer-Verlag 1962)

(7) H.J. Karl: Untersuchungen über 17-Hydroxycorticosteroide in Plasma und Urin in freier und veresterter Form. Klin. Wschr. 37 21 (1959)

(8) K. Schwarz: Zur Frage der Wirkung des Phenylbutazon auf die Funktion der Nebennierenrinde und auf die biologische Halbwertszeit von Cortisol. Klin. Wschr. 38 5 (1960)

(9) W. Staib: Steroidbestimmung in Körperflüssigkeiten.
Dtsch. Med. Wschr. 87 10 (1962)

(10) W. Bernauer: Eine einfache Methode zur quantitativen Corticosteroidbestimmung in Verbindung mit der Dünnschichtchromatographie.
Klin. Wschr. 41 17 (1963)

(11) A. Kassenaar, A. Molenaar u. H. Nijland
Acta endocr. (Kbh) 18 60 (1955) zit. nach G. W. Oertel

(12) P.K. Bondy, D. Abelson, J. Scheuer, T.K.L. Tseu u. V. Upton:
J. Biol. Chem. 224 47 (1957) zit. nach G. W. Oertel

LEBENSLAUF

Am 2. Januar 1941 wurde ich als Sohn des Alex Straile und seiner Frau Lore, geb. Klöss, in München geboren. Vom September 1947 bis Juli 1951 besuchte ich die Volksschule an der Rotbuchenstraße in München.
Im Herbst 1951 trat ich in das Theresien-Gymnasium in München über, wo ich im Juli 1960 das Zeugnis der Reife erwarb.
Von der Pflicht zum Wehrdienst wurde ich befreit, da ich der einzige Sohn meines im Jahre 1941 gefallenen Vaters bin.
Im November 1960 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Medizin, das ich nach elf Semestern mit der Ärztlichen Staatsprüfung erfolgreich abschloß, nachdem ich nach zwei Semestern die Naturwissenschaftliche und nach weiteren drei Semestern die Ärztliche Vorprüfung mit Erfolg abgelegt hatte.
Seit dem 2. November 1966 bin ich auf der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder in Regensburg als Medizinalassistent tätig.

Herrn Prof. Dr. N. Zöllner danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung meiner Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Dr. med. Wolfram für viele wertvolle Hinweise.